

UREA DETECTION ELEMENT

Patent Number: JP61225659
Publication date: 1986-10-07
Inventor(s): OKADA TAKESHI; others: 02
Applicant(s):: NITTO ELECTRIC IND CO LTD
Requested Patent: ☐ JP61225659
Application Number: JP19850067839 19850329
Priority Number(s):
IPC Classification: G01N33/62
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To achieve a higher sensitivity and reproducibility, by providing a porous thin film on the surface of a transparent support to be impregnated with urease and an indicator.

CONSTITUTION: A porous thin film such as unwoven fabric and filter paper is fastened on a transparent support comprising a polymer such as polycarbonate and polyvinyl compound by bonding and is impregnated with an urease solution and an indicator such as bromophenol blue and cresol red. The amount of the urease, the indicator and the assistant used is preferably 2-20wt%, 3-10wt% and 1-20wt% for solid concentration, for example, per the weight of a water soluble binder. The amount of heavy metal ion trapping shall be set within the range of about 0.5-20wt%. Thus, the amount of urea can be measured accurately.

Data supplied from the esp@cenet database - 12

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-225659

⑬ Int.Cl.⁴
G 01 N 33/62識別記号
庁内整理番号
8305-2G

⑭ 公開 昭和61年(1986)10月7日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 尿素検出素子

⑯ 特 願 昭60-67839

⑰ 出 願 昭60(1985)3月29日

| | | | |
|---------|------------|---------------|-------------|
| ⑱ 発 明 者 | 岡 田 猛 | 茨木市下穂積1丁目1番2号 | 日東電気工業株式会社内 |
| ⑱ 発 明 者 | 日 比 野 健 | 茨木市下穂積1丁目1番2号 | 日東電気工業株式会社内 |
| ⑱ 発 明 者 | 木 原 康 夫 | 茨木市下穂積1丁目1番2号 | 日東電気工業株式会社内 |
| ⑲ 出 願 人 | 日東電気工業株式会社 | 茨木市下穂積1丁目1番2号 | |
| ⑳ 代 理 人 | 弁理士 山本 秀策 | | |

明 細 書

1. 発明の名称

尿素検出素子

2. 特許請求の範囲

1. 光透過性支持体と該支持体上に設けた試薬層とを有し、該試薬層が多孔性薄膜にウレアーゼおよび指示薬を一体的に含浸させてなる尿素検出素子。

2. 前記多孔性薄膜が不織布である特許請求の範囲第1項に記載の尿素検出素子。

3. 前記多孔性薄膜が合成高分子膜である特許請求の範囲第1項に記載の尿素検出素子。

4. 前記多孔性薄膜が濾紙である特許請求の範囲第1項に記載の尿素検出素子。

5. 前記不織布がポリエステル、ポリプロピレン、ポリエチレンおよびナイロンのうちの少なくとも一種からなる特許請求の範囲第2項に記載の尿素検出素子。

6. 前記合成高分子膜がセルロース誘導体、エチレン-酢酸ビニル共重合体ケン化物、ポリアミ

ドおよびポリイミドのうちの少なくとも一種からなる特許請求の範囲第3項に記載の尿素検出素子。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、尿素検出素子、特に、薬剤層が多孔性薄膜にウレアーゼと指示薬とを一体に含浸させてなる尿素検出素子に関する。

(従来技術)

体液中の尿素量の測定は、腎臓病等の疾患の診断および経過のコントロールのために重要である。

また、サメやエイ等の板鰐魚は、体内に多量の尿素を含んでおり、その量は、これら魚の捕獲後の低温貯蔵期間中に、鮮度の低下とともに変化する。それゆえ、魚の体内の尿素量の測定は、その鮮度の評価に役立つ。さらに、サメ肉を使用して練製品を製造する場合、肉中の尿素が異臭などの品質劣化の原因となるため、製造工程において水晒処理がなされる。この水晒処理後の尿素残存量の測定は、処理工程の制御に利用される。

尿素量の測定は、一般に、湿式法あるいは溶液

法と呼ばれる方法により行われている。この溶液法としては、尿素をジアセチルモノオキシムと直接に反応させ、生成した化合物の色吸収を光度計で測定する方法がある。溶液法には、また、(1)尿素にウレアーゼを作用させてこれを炭酸アンモニウムに分解し、アンモニアを遊離させる；(2)このアンモニアをネスラー試薬と反応させるか、またはフェノール/次亜塩素酸塩を用いて着色インドフェノールに変換する；次いで、(3)それぞれ生成した着色反応生成物を比色定量する、という尿素量を間接的に測定する方法がある。これらの方法は、いずれも高価な装置と正確な測定技術を必要とし、また測定時間が長いという欠点がある。

これら溶液法の欠点を除去し、尿素量の測定の簡易化および迅速化をはかり、測定者の個人差をなくするために、近年、乾式法と呼ばれる方法が提案されている（例えば、臨床検査 Vol.22, No.11 1203~1218 (1978年)）。乾式法としては、例えば、特開昭52-3488号公報に多層型の分析素子が開示されている。この分析素子は、光透過性支持

体上に、ウレアーゼおよびアルカリ性緩衝剤を含有する試薬層と、アンモニアガスを検出する指示薬層とを有し、両層の間にアンモニアガスのみを選択的に透過させる選択透過層を設けた構成である。この分析素子では、選択透過層におけるアンモニアガスの拡散速度が遅く、そのため感度が低い。感度を上げるべく透過層の層厚を薄くすれば、アンモニアガスのほかに液体も透過するため、正確な測定が不可能になる。また、アンモニアガスの拡散透過時間は、透過層の厚さにより著しく異なる。そのため、透過層の厚さを一定かつ均一にすることが必要であるが、それには高度の技術を要する。選択透過層と試薬層との接着も難しい。

上記従来技術の欠点を解消し、特に、感度を改良した分析素子は、特開昭54-151096号公報、特開昭58-77660号公報および特開昭58-77661号公報に開示されている。しかし、これらいずれの素子も多層構造のため、各層の接着が困難である。その結果、製造工程が複雑になる。測定値の再現性にも欠ける。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明は上記従来の問題点を解決するものであり、その目的とするところは、製造工程の簡単な尿素検出素子を提供するところにある。本発明の他の目的は、高感度でかつ測定値に再現性のある尿素検出素子を提供するところにある。

(問題点を解決するための手段)

本発明は、試薬層にウレアーゼと指示薬とを一体的に含浸させることにより、高感度でかつ測定値の再現性の高い尿素検出素子が簡単に得られる、との発明者の知見にもとづいて完成された。

本発明の尿素検出素子は、光透過性支持体と該支持体上に設けた試薬層とを有し、該試薬層が多孔性薄膜にウレアーゼおよび指示薬を一体的に含浸させてなり、そのことにより上記目的が達成される。

光透過性の支持体には、公知のあらゆる疎水性の透明支持体が用いられる。この透明支持体は、例えば、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、ポリビニル化合物のようなポリマーカ

ら形成される。支持体の厚さには特に制限はないが、好ましくは200~400 μ mである。

多孔性薄膜には、不織布、合成高分子膜、濾紙、pH試験紙などが使用される。不織布の素材は、ポリエステル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ナイロンなどが好ましい。合成高分子膜の素材には、例えば、セルロース誘導体、エチレン-酢酸ビニル共重合体ケン化物、ポリアミド、ポリイミドがある。これらの素材は、ウレアーゼならびに指示薬の含浸性、ウレアーゼの反応性および指示薬の発色性などに応じて適宜選択される。多孔性薄膜の厚さも、上記含浸性および反応性から、透明支持体の厚さの2~3倍程度が好ましい。またその表面積は25~100 cm^2 がよい。

ウレアーゼは、少なくとも蒸留水に溶解し、水溶液の状態にして用いられる。ウレアーゼの反応性および素子の保存中におけるウレアーゼの安定性などを向上させるため、通常、この水溶液には助剤が加えられる。この助剤には、例えば、湿潤剤、安定剤、水溶性バインダーおよび重金属イオ

ントラップ剤がある。水溶性バインダーには、ゼラチン、カゼイン、アガロース、メチルセルロースおよびポリアクリルアミドなどが挙げられる。重金属イオントラップ剤は、ウレアーゼの酵素活性を阻害する重金属イオンのマスキングに使用される。このトラップ剤には、エチレンジアミン四酢酸塩、ニトリロトリ酢酸、ジエチレントリアミンペンタ酢酸のようなコンプレクサンが用いられる。

指示薬には、その溶液中のpHが中性からアルカリ側にシフトしたとき、発色変化する化合物が使用される。本発明の検出素子に使用可能な指示薬には、例えば、ブロムフェノールブルー、ブロムチモールブルー、キノリンブルー、ロゾール酸、クレゾールレッド、アゾリトミン、ニュートラルレッドおよびチモールブルーがある。これら指示薬は、蒸留水もしくは希薄な有機溶媒で希釈して用いられる。

ウレアーゼ、指示薬および助剤の使用量は、例えば、水溶性バインダー（例えば、ゼラチンで固

形分濃度5～10%）の重量に対して、ウレアーゼが0.1～50重量%（好ましくは、2～20重量%）、指示薬が10～70重量%（好ましくは、3～10重量%）、固形分濃度1～20重量%）、そして重金属イオントラップ剤が0.5～20重量%の範囲内で適当に設定される。

上記材料を用いて、本発明の尿素検出素子は次のようにして作製される。

透明支持体の表面に多孔性薄膜を、例えば、接着により固定する。接着には両面テープなどが使用される。この多孔性薄膜にウレアーゼ溶液および指示薬を、別々にあるいは両者を混合して含浸させる。別々に含浸させる場合、指示薬を先に含浸させる方が好ましい。薄膜にpH試験紙を用いる場合、指示薬を含浸させる必要はない。ウレアーゼ、指示薬および助剤の量は、いずれの含浸方法においても前記条件に従う。製造工程における指示薬の発色防止のため、エタンスルホン酸、クエン酸、P-トルエンスルホン酸、過塩素酸、塩酸などの有機酸あるいは無機酸を多孔性薄膜に加え

ることが好ましい。これらの酸は、指示薬のpHを非発色域のpH（酸性側）に調整する。

ウレアーゼ溶液および指示薬を含浸させた多孔性薄膜は、乾燥して試薬層を形成する。試薬層およびそれを支持する透明支持体は、尿素検出素子として使用される。

本発明の尿素検出素子を用いて、例えば、次のように尿素量が測定される：

尿素を含む液体試料にウレアーゼを作用させると、尿素はアンモニアと二酸化炭素に分解する。このときに生じるアンモニアにより、反応溶液のpHがアルカリ側にシフトする。この原理を応用して、試料中の尿素量が測定される。

本発明の尿素検出素子は、その試薬層にウレアーゼを含んでいるため、上記のような尿素分解反応を起こす作用がある。

本発明の尿素検出素子の試薬層表面に、尿素を含む液体試料（約5～30μl）を点着し、25～40℃（好ましくは35～39℃）で1～20分（好ましくは3～10分）反応させる。反応により反応溶液の

pHがアルカリ側にシフトする。このpH変化をpH指示薬の色調変化でとらえ、これを視覚的または透明支持体側から光学的に測定する。これとは別に、既知量の尿素を含む標準試料を用いて同様の反応を行い、pH変化の測定値と尿素量との関係をプロットして検量線とする。この検量線を用いて、未知試料の尿素量が算出される。

（実施例）

以下に本発明を実施例について述べる。

実施例1

透明ポリエチレンテレフタレート（PET）フィルムベース上に透明の両面テープで濾紙（5mm×5mm）を接着させた。この濾紙に以下に示した組成の指示薬とウレアーゼ溶液を順次含浸させた。試薬量は、いずれも濾紙表面の単位平方ミリメートル当たりの量である。

指示薬

| | |
|------------|------|
| ブロムチモールブルー | 2 g |
| アセトン | 50 g |
| 蒸留水 | 50 g |

ウレアーゼ溶液

| | |
|--------------------|--------|
| ゼラチン | 10 g |
| ウレアーゼ (360,000U/g) | 1 g |
| 蒸留水 | 100 ml |
| エチレンジアミン四酢酸塩 (Na塩) | 0.4 g |

ウレアーゼ溶液のpHは、NaOHで調整された。

指示薬をまず濾紙に塗布して乾燥し、その後ウレアーゼ溶液を含浸させ乾燥させた。得られた尿素検出素子を下記のような方法で評価した。

採取した20検体の人尿を15μlずつ素子上に点着し、室温で5分後の色調変化を標準色（あらかじめ既知の濃度の尿素溶液で色調変化を調べておく）と対比させ、尿中の尿素濃度を測定した。

実施例2

実施例1で作製した尿素検出素子を用いて、2℃でアオザメ筋肉（一定期間冷却貯蔵した）中の尿素量を測定した。

尿素を含む筋肉抽出液は、次のようにして調製された。まず、一定量のサメ肉を採取し、これをその重量の5倍量の10%過塩素酸に加えてホモジ

ナイズした。この混合物を遠心分離して上澄み液を抽出した。この液をKOHでpH 6.8に調整して尿素含有抽出液とした。

この尿素含有抽出液の尿素量は、実施例1と同様の方法で測定された。

サメ肉の貯蔵日数と尿素量との関係を図に示す。この図はサメ肉の鮮度評価の指標になりうる。

（発明の効果）

本発明の尿素検出素子は、このように、試薬層がウレアーゼ層および指示薬層の両層の機能を有するため、製造工程が簡単である。また測定値に再現性がある。その結果、尿素量の正確な測定が可能である。

4. 図面の簡単な説明

図は、本発明の実施例2において、測定された尿素量とサメ肉の貯蔵期間との関係を示す図である。

以上

代理人 弁理士 山本秀策

